2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ９ 月 ２３ 日現在

機関番号： １２１０２
研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2014～2016
課題番号： ２６８６０５９６

研究課題名（和文） 気道リモデリング形成に伴うSiglecを介した好酸球炎症制御経路障害の解明

研究課題名（英文） Dysfunction of Siglec regulated eosinophilic airway inflammation induce airway remodeling.

研究代表者

際本　拓未（Kiwamoto, Takumi）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：８０７２４７７３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：気管支喘息の難治化要因である気道リモデリングにSiglec経路が及ぼす影響を研究した。Siglecは炎症細胞に主に発現する糖鎖結合蛋白であり、マウスSiglec-Fは主に好酸球に発現する。Siglec-FのリガンドとしてMuc5bとMuc4を同定した。また、気道リモデリング形成をきたすような慢性好酸球性気道炎症時にはSiglec-F リガンドの発現量が亢進していた。ヒアルロン酸合成酵素HAS2機能異常はSiglec経路を阻害し、喘息を難治化する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We studied the influence of Siglec pathway on airway remodeling, which is a refractory factor of bronchial asthma. Siglec is a sugar chain-binding protein mainly expressed in inflammatory cells, mouse Siglec-F is mainly expressed on eosinophils. Muc 5b and Muc 4 were identified as ligands for Siglec-F. In addition, the expression level of Siglec-F ligand was increased when airway remodeling was progressed. Hyaluronan synthase HAS2 dysfunction seemed to inhibit the Siglec pathway and may induce refractory asthma.

研究分野： 呼吸器内科学

キーワード： Siglec-F　気道リモデリング　HAS2　Siglec　Muc5b　Muc4

１．研究開始当初の背景

Siglec はシアル酸結合部位を持ち、主に免疫系の細胞に発現する糖鎖結合型レセプターである。マウス Siglec-F は人における Siglec-8 に相当し、主に好酸球に発現している。Siglec-F/-8 経路の活性化は好酸球のアポトーシスを誘導する。

申請者は申請当時、Siglec-F のリガンドが気道上皮細胞、気管粘膜下腺に発現していることを確認していた。これらは好酸球性気道炎症発生時に増強していることから、過剰な炎症反応を抑制する役割を持っているものと考えられている。よって、Siglec-F/-8 経路は気管支喘息のような好酸球性気道炎症の終息機構に重要な役割を果たすものと期待されている。

さらに申請者らは糖鎖生化学的手法を用いた解析により、これまで未知であった Siglec-F リガンドが粘液ムチン(Muc4 及び Muc5b）であることを特定した。

これらの結果より、好酸球炎症の病態制御機構において Muc4 および Muc5b が Siglec を介して重要な役割を果たしているものと推測されるが、難治性気管支喘息治療の課題である気道リモデリングといった上皮機能が障害された病態でこの経路が受ける影響は明らかにされていない。

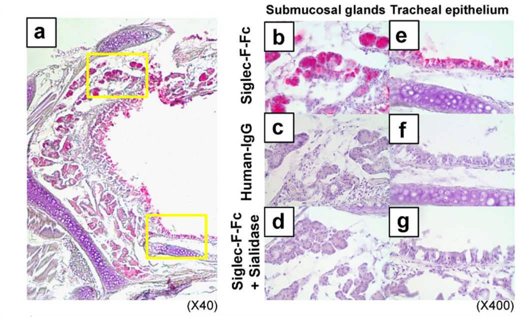

図 1. マウス Siglec-F ligand の分布

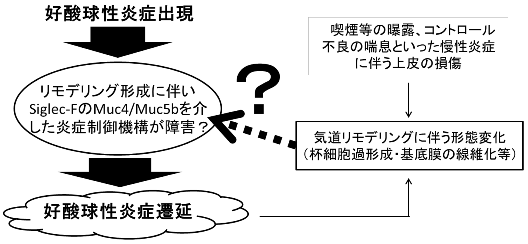

図 2. 気道リモデリングに伴う Siglec-F 経路の破綻機序（仮説）

２．研究の目的

気道リモデリング形成が粘液ムチン（Muc4/Muc5b）等の糖鎖による Siglec を介した炎症制御機構に及ぼす影響を検証し、実際の病態との関連を調べることで、新しい診断方法や標的治療応用へ展開するための基盤となる研究を行う。また、計画遂行中に Siglec と新規喘息関連遺伝子 HAS2 の関連が示唆されたためこれについても検証を行った。

３．研究の方法

(1) <u>Muc5b/Muc4 による Siglec-F を介した好酸球炎症制御機構の検証</u>

背景で述べた通り、マウス気道上皮初代培養細胞 (mouse tracheal epithelial cells: mTEC)及び肺検体を採取、Siglec-F-ヒト IgG キメラ蛋白で標識したリガンドをイムノブロット、免疫組織染色、質量分析を行い同定した。同定後、イオン交換クロマトグラフィーにてリガンドを抽出・機能解析を行った。また、Muc5b 欠損マウスを使用し Siglec-F ligand 発現および好酸球性気道炎症増悪の有無を検証した。最後に抽出した Muc5b/Muc4 が Siglec-F を介して好酸球アポトーシスを誘導するかを検証した。

(2) <u>気道リモデリング形成時の Siglec-F リガンド発現量変化</u>

気道リモデリングの病態モデルを共同研究者より導入予定の Siglec-F 欠損マウスと同じ、C57BL6 系マウスで卵白アルブミン（OVA）長期刺激により作成、Siglec-F ligand の発現量の変化の有無の検証を行った。また、上述のマウス Muc5b および Muc4 の発現量についてもウェスタンブロット法で検証を試みた。

(3) <u>HAS2 と Siglec</u>

申請者が所属する研究室ではヒト喘息患者検体を用いたゲノムワイド関連解析により、ヒアルロン酸合成酵素 HAS2 の遺伝子多型が喘息感受性を持つ可能性があることを独自に見出した(Yatagai Y, et al. ***Clin Exp Allergy***. 2014.)。 HAS2 はヒアルロン酸合成酵素の１つであり、高分子量ヒアルロン酸(HMW-HA)の合成に関与する。また抗炎症作用を持つことが知られている HMW-HA は炎症細胞に抑制作用をもたらす Siglec の結合活性を持つ可能性も近年示唆されており、検証を行った。

C57BL6 系の野生型（WT）および HAS2 ヘテロ欠損（$HAS2^{+/-}$）マウスを用い、HAS2 機能低下がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響を OVA 刺激による好酸球性気道炎症モデルを作成、比較した.

４．研究成果

(1) Muc5b/Muc4 による Siglec-F を介した好酸球炎症制御機構

mTEC 抽出物、mTEC 培養上清、マウス肺抽出物、気管支肺胞洗浄液についてそれぞれ Siglec-F とヒト IgG-Fc 領域とのキメラタンパク質（Siglec-F-Fc）を用いたイムノブロットを行った。その結果、分子量約 500kDa 付近および 200kDa 付近にシグナルが検出された。これらのシグナルはシアリダーゼ処理によって消失したことから Siglec-F-Fc の結合はシアル酸を介したものであることが示された。次に Siglec-F 結合タンパク質をマグネットビーズによって濃縮し、トリプシン処理後ペプチド断片のプロテオミクス解析を行った。その結果、500kDa には Muc5b と Muc4α鎖が、200kDa には Muc4β鎖がそれぞれ含まれることが明らかとなった。そこで、mTEC 培養上清より抽出した Siglec-F 結合タンパク質に対して抗マウス Muc5b 抗体を用いてウェスタンブロットを行うと、500kDa 付近にバンドが確認されるが、シアリダーゼ処理後の抽出検体に対しては反応性を示さなかった。さらに、背景で述べた通り、野生型マウスの気道組織において、上皮細胞および粘膜下腺に選択的な Siglec-F 染色が観察されたが、Muc5b ノックアウトマウスでは粘膜下腺の染色は見られなかった。以上より、Muc5b および Muc4 がマウス Siglec-F 結合能を持つことが示された。

同定されたムチンがリガンド活性を有するかを検討するため、IL-5 トランスジェニックマウスより採取した好酸球を用いたフローサイトメトリー分析を実施した。その結果、Muc5b/Muc4 混合物（mTEMucs）のビオチン標識物は、マウス好酸球と Siglec-F を介してに結合することが示された。また in vitro 実験において Muc5b/Muc4 混合物は好酸球の生存率を有意に低下させた。さらに Muc5b 遺伝子の肺特異的コンディショナルノックアウトマウスにおいて、IL-13 の投与に応答して好酸球数の顕著な増加と好酸球アポトーシスの割合の減少が観察され、in vivo においても Muc5b ムチンが好酸球の過剰な炎症を抑制する可能性が示された。

(2) 気道リモデリング形成時の Siglec-F リガンド発現量変化

OVA 長期刺激により C57BL6 系マウスにおいても気道構造変化を伴う気道リモデリングモデルが作成可能であることを確認した。

また、予備実験において、気道リモデリングモデルにおいても高度の気道炎症をきたしている群においてリガンドの発現量が亢進していることが示唆された。今後は実際の病態において、ムチン分画ごとのリガンド活性の変化等を検証していく予定である。

(3) HAS2 と Siglec

ウェスタンブロット法を用いた検討では野生型マウス肺において OVA 刺激後に HAS2 の発現量の増加が示唆された。

また、HAS2$^{+/-}$群の OVA 刺激後の BAL 中の好酸球数は WT 群と比較し高値であった。以上より、HAS2 が好酸球性気道炎症を抑制している可能性が示唆された。今後も検体の蓄積を継続し、長期暴露モデルでの気道リモデリングの有無の検証および Siglec 経路の関与の有無の検証を行う。

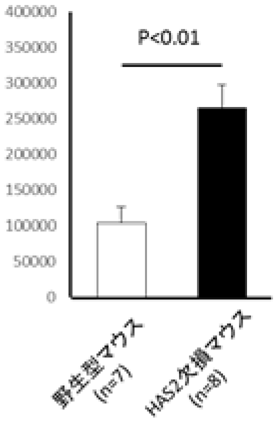

図 3. OVA 刺激後の BAL 中の好酸球数の比較

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　8 件）

① **Kiwamoto T**, Katoh T, Evans CM, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS. Sialylated glycans carried by airway mucins Muc5b and Muc4 selectively bind to mouse Siglec-F and control eosinophilic airway inflammation. *Proceedings of the 30th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum*. 30, 29-32, 2016.
査読有, DOI:なし

② Matsuishi Y, Jesmin S, Kawano S, Hideaki S, Shimojo N, Mowa CN, Akhtar S, Zaedi S, Khatun T, Tsunoda Y, **Kiwamoto T**, Hizawa N, Inoue Y, Mizutani T. Landiolol hydrochloride ameliorates acute lung injury in a rat model of early sepsis through the suppression of elevated levels of pulmonary endothelin-1. *Life Sci*. 166, 27-33, 2016.
査読有, DOI: 10.1016/j.lfs.2016.10.010.

③ 角田 義弥, **際本 拓未**, 加藤 紀彦, 檜澤 伸之. 気道ムチン糖鎖は Siglec-F のリガンドとして好酸球のアポトーシスを誘導する. *臨床免疫・アレルギー科*, 65, 468-471, 2016.
査読無, DOI:なし

④ Bochner BS, **Kiwamoto T**, Katoh T, Zhu Z, Tiemeyer M. Reply: To PMID 25497369. *J Allergy Clin Immunol*. 135, 1662-1663, 2015.
査読有, DOI: 10.1016/j.jaci.2015.02.028.

⑤ **Kiwamoto T**, Katoh T, Evans CM, Janssen WJ, Brummet ME, Hudson SA, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS. Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis. *J Allergy Clin Immunol*. 135, 1329-40, 2015.
査読有, DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.027.

⑥ 加藤 紀彦, **際本 拓未**. Siglec-Fとムチン相互作用による好酸球炎症制御. *The lung, perspectives*, 23, 180-185, 2015.
査読無, DOI:なし

⑦ **際本 拓未**, 檜澤 伸之. Siglecとアレルギー性気道炎症. *呼吸*, 34, 21-24, 2015.
査読無, DOI:なし

⑧ **Kiwamoto T**, Brummet ME, Wu F, Motari MG, Smith DF, Schnaar RL, Zhu Z, Bochner BS. Mice deficient in the St3gal3 gene product α2,3 sialyltransferase (ST3Gal-III) exhibit enhanced allergic eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 133, 240-247, 2014.
査読有, DOI: 10.1016/j.jaci.2013.05.018.

〔学会発表〕(計　6件)

① Tsunoda Y, **Kiwamoto T**, Sakurai H, Lin SY, Matsuno Y, Kawaguchi M, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N. Attenuation of Hyaluronan synthase 2 (HAS2) enhance eosinophilic airway inflammation. American Thoracic Society International Conference 2017, 2017年5月23日, ワシントンDC（米国）

② 角田 義弥, **際本 拓未**, 櫻井 啓文, 林 士元, 松野 洋輔, 川口 未央, 森島 祐子, 石井 幸雄, 檜澤 伸之. 好酸球性気道炎症病態下におけるヒアルロン酸合成酵素HAS2の役割. 第57回日本呼吸器学会学術講演会, 2017年4月23日, 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区)

③ **Kiwamoto T**, Katoh T, Evans CM, Janssen WJ, Brummet ME, Hudson SA, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS. Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis. 第64回日本アレルギー学会学術大会, 2015年5月26日, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都, 港区)

④ **Kiwamoto T**, Katoh T, Evans CM, Janssen WJ, Brummet ME, Hudson SA, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS. Mouse airway Muc5b and Muc4 carry glycans that induce eosinophil apoptosis via Siglec-F. 2015 KAAACI & EAAS Joint International Congress, 2015年5月8日, ソウル (韓国)

⑤ **Kiwamoto T**, Katoh T, Evans CM, Janssen WJ, Brummet ME, Hudson SA, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS. Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis. Joint meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, 2014年11月17日, ホノルル（米国）

⑥ **際本 拓未**, 加藤 紀彦, Evans CM, Janssen WJ, Brummet ME, Hudson SA, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS. 気道粘液Muc5b/Muc4によるSiglec-Fを介した好酸球炎症制御機構. 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 2014年4月25日, 大阪国際会議場 (大阪府, 大阪市)

〔図書〕(計　0件)

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0件）

○取得状況（計　0件）

〔その他〕
なし

６．研究組織

(1)研究代表者
際本　拓未（KIWAMOTO, Takumi）
筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80724773

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし